

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

RECD 31 DEC 2001

WIPO PCT

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T14


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050669	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08222	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 01/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT, et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 12 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 24/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Barz, W Tel. Nr. +49 89 2399 7320



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-26 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-22 mit Telefax vom 31/10/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-5, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 6-7 (IA).

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 6-7 (IA) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
 - ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3, 13
	Nein: Ansprüche	1-2, 4-12, 14-22
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-22
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-5, 8-22
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

PUNKT I:

Die mit Schreiben vom 31.10.01 eingereichten Änderungen des **Anspruchs 22** bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34 (2) b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen. Es handelt sich dabei um folgende Änderungen in der allgemeinen Formel I:

- 1) Deletion einer Methylengruppe zwischen Doppelbindung und $(CH_2)_n$ -Gruppe,
- 2) Umwandlung von $(-CH_2-)_n$ in $(-CH_3-)_n$. Hierdurch entstehen 5-bindige Kohlenstoff-Atome, die chemisch unmöglich sind!

Aus diesem Grunde wurden die Änderungen des **Anspruchs 22** bei der Erstellung des vorliegenden Internationalen Vorläufigen Prüfungsberichts nicht berücksichtigt (Regel 70.2 (c) PCT).

PUNKT III:

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden **Ansprüche 6-7** (soweit sie sich auf Menschen beziehen) gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34 (4) (a) (i) PCT). Siehe jedoch Punkt V-3.

PUNKT V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 98 46762 A (COMMONW SCIENT IND RES ORG), 22. Oktober 1998;
D2: WO 97 37033 A (BAFOR M. ET AL.), 9. Oktober 1997;
D3: WO 98 56922 A (DU PONT), 17. Dezember 1998;
D4: US-A-5 850 026 (DEBONTE L.R. UND HITZ W.D.), 15. Dezember 1998;
D5: WO 94 11516 A (DU PONT), 26. Mai 1994;

- D6: FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, Bd. 89, 1987, Seiten 227-230,
(Meier zu Beerentrup H. und Röbbelen, G.), ISSN: 0931-5985;
- D7: JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY PERKIN TRANSACTIONS I,
Nr. 11, 1985, Seiten 2425-2434, (Crombie L. und Holloway S.J.),
ISSN: 0300-922X;
- D8: PLANT PHYSIOLOGY (Linsen I. et al.), Bd. 113, 1997, Seiten 1343-1349,
ISSN: 0032-0889;
- D9: WO 97 35987 A (PIONEER HI BRED INTL. INC.), 2. Oktober 1997;
- D10: 'The Lipid Handbook: Second Edition' (Gunstone F.D. et al.), 1994,
Seiten 7, 51 und 109, CHAPMAN & HALL, LONDON;
- D11: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,
1998 (Dhar P. und Bhattacharyya D.K.), Database accession no.
PREV199900002659 & ANNALS OF NUTRITION & METABOLISM, Bd. 42,
Nr. 5, 1998, Seiten 290-296, ISSN: 0250-6807;
- D12: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,
Bd. 188, Nr. 3, 1992, Seiten 1220-1227, (Hamberg M.), ISSN: 0006-291X.

1. NEUHEIT

Die **Ansprüche 1-2, 4-12 und 14-22** erfüllen aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT:

- 1.1 Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität kodieren und alle Merkmale der Gruppe b) oder c) des vorliegenden **Anspruchs 1** enthalten, sind in den Dokumenten D1 (Zusammenfassung; SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:3; Beispiel 1; Ansprüche 1 und 15), D2 (Zusammenfassung; SEQ ID NO:2; Ansprüche 5-7), D3 (Zusammenfassung; SEQ ID NOs 1 und 3; Ansprüche 1-2 und 5-6), D4 (Zusammenfassung; SEQ ID NO's 1, 3 und 5) und D5 (SEQ ID NO's 1, 3, 5, 7, 11 und 15; Ansprüche 1-5) offenbart. Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist daher nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT.

Die mit der Internationalen Vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde kann dem Argument des Anmelders (siehe Schreiben vom 31.10.01) nicht zustimmen, daß Epoxygenasen (wie sie in D1 und D3 offenbart sind) und Acetylenasen (die z.B.

aus D2 bekannt sind) keine Desaturase-Aktivität besäßen, weil Desaturasen ausschließlich die Einführung von Doppelbindungen katalysierten. Vielmehr scheint der Begriff "Desaturase" im Stand der Technik als Oberbegriff für Enzyme verwendet zu werden, die die Oxidation von gesättigten Fettsäuren katalysieren (siehe die IUBMB Enzym-Nomenklatur, z.B. EC 1.14.99.33 für Acetylenasen, siehe "www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme" oder "us.expasy.org/enzyme"). Die im vorliegenden Anspruch 1 beanspruchten Nukleinsäuresequenzen für Polypeptide mit Desaturaseaktivität werden daher durch die in D1-D3 offenbarten Sequenzen vorweggenommen.

Die mit der Internationalen Vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde kann auch dem Argument des Anmelders (siehe Schreiben vom 31.10.01) nicht zustimmen, die in D3-D5 offenbarten Desaturasen wären nicht neuheitsschädlich für die vorliegende Anmeldung, weil sie über den gesamten Aminosäurebereich eine deutlich geringere Homologie besäßen (als die in Anspruch 1 (c) genannten 75%). Die Gründe hierfür sind:

- a) Der Begriff "Homologie" ist unklar und nicht identisch mit "Sequenzidentität" (siehe auch Punkt VIII-1.);
- b) Anspruch 1 beansprucht nicht, daß die Homologie mindestens 75% "über den gesamten Aminosäurebereich" betragen solle.

1.2 Auch Aminosäuresequenzen mit allen Merkmalen des vorliegenden **Anspruchs 2** sind aus D1 (Zusammenfassung; SEQ ID NO's 1-4; Ansprüche 28-32), D2 (SEQ ID NO:2), D3 (Zusammenfassung; SEQ ID NO's 2 und 4; Anspruch 1 und 5), D4 (Zusammenfassung; SEQ ID NO's 2, 4 und 6) und D5 (SEQ ID NO:1-8) bekannt. Der Gegenstand des Anspruchs 2 ist daher ebenfalls nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT.

1.3 Auch die **Ansprüche 4-5** sind nicht neu (Artikel 33(2) PCT), weil die Dokumente D1-D5 auch Konstrukte und Vektoren mit allen Merkmalen dieser Ansprüche offenbaren (siehe die oben zitierten Passagen, die Beispiele von D1-D5 sowie Anspruch 19 von D1 und Ansprüche 3 und 7 von D3).

- 1.4 Analoge Einwände gelten für die **Ansprüche 6-8**, weil transgene Pflanzen und andere Organismen mit allen Merkmalen dieser Ansprüche ebenfalls aus D1-D5 bekannt sind (siehe die Beispiele von D1-D5 sowie: Ansprüche 45-49 von D1; Ansprüche 12-15 von D2; Ansprüche 4 und 8-9 von D3; Ansprüche 1-13 von D4).
- 1.5 Auch Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren oder Triglyceriden mit allen Merkmalen der **Ansprüche 9-12 und 14** sind nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT, weil D1-D5 derartige Verfahren offenbaren (siehe die Beispiele sowie: Ansprüche 20-23 und 33-44 von D1; Ansprüche 1-4 und 9-11 von D2; Anspruch 14 von D3; Ansprüche 14-23 von D4; Ansprüche 10-11 von D5).
- 1.6 Ein Produkt kann nicht deswegen als neu angesehen werden, weil es durch ein neues Verfahren erzeugt wird. Die **Ansprüche 15-18**, deren Gegenstand durch das Herstellungsverfahren der beanspruchten Fettsäuren bzw. Triglyceride definiert wird, erfüllen daher nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil derartige Fettsäuren bzw. Triglyceride in zahlreichen Dokumenten des Standes der Technik offenbart sind (siehe z.B. D1-D10).

Aus den unter Punkt V-1.1 genannten Gründen kann die mit der Internationalen Vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nicht dem Argument des Anmelders (siehe Schreiben vom 31.10.01) zustimmen, bei den durch das vorliegende Verfahren hergestellten Fettsäuren bzw. Triglyceriden handele es sich aufgrund der "spezifischen enzymatischen Aktivität, die eine Doppelbindung in Konjugation zu einer vorhandenen Doppelbindung in das Molekül einführt, um eine neue Fettsäurezusammensetzung bzw. um neue Triglyceride, die diese Fettsäuren enthalten". Vielmehr können die in den Ansprüchen 15-18 beanspruchten Fettsäuren bzw. Triglyceride nicht als neu (Artikel 33(2) PCT) angesehen werden, weil weder die Sequenzen des vorliegenden Anspruchs 1 noch die Verfahren der vorliegenden Ansprüche 9-12 neu sind (siehe oben).

- 1.7 Auch der Gegenstand der **Ansprüche 19-20** ist nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT, weil D1-D5 Verwendungen mit allen Merkmalen dieser Ansprüche offenbaren (siehe die Beispiele sowie: Ansprüche 33-44 von D1; SEQ ID NO:1 und Ansprüche 8-10 von D2; Ansprüche 13-17 von D3; Seite 46, Zeilen 7-10; Seite 48, Zeilen 16-28; Seite 53, Zeilen 4-9; Anspruch 10 von D5).

- 1.8 Da die Verwendung von Fettsäuren oder Triglyceriden zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika aus unzähligen Dokumenten bekannt ist (siehe Lehrbücher), erfüllt auch **Anspruch 21** nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT.
- 1.9 Ein Enzym mit allen Merkmalen des vorliegenden **Anspruch 22** (wobei $n=3$ und $R^2 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ (ein ungesättigtes C_8 -Alkyl) sind) wird in Dokument D12 offenbart (Zusammenfassung, Abb. 1 und 4). Der Gegenstand des Anspruchs 22 ist daher auch nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT.
- 1.10 Die verbleibenden **Ansprüche 3 und 13** sind neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT, weil der verfügbare Stand der Technik keine Sequenzen oder Verfahren mit allen Merkmalen dieser Ansprüche offenbart.

2. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT

Jedoch erfüllen die **Ansprüche 3 und 13** aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT:

- 2.1 Verglichen mit den Dokumenten D1-D5 unterscheidet sich der Gegenstand des **Anspruchs 3** nur dadurch, daß die Aminosäuresequenz durch SEQ ID NO:1 kodiert wird. Die mit diesem Anspruch zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, eine alternative Desaturase-Aminosäuresequenz bereitzustellen. Da der Stand der Technik jedoch die Sequenzen zahlreicher Desaturasen offenbart (siehe oben), wäre es für den Fachmann naheliegend, weitere Desaturasen zu identifizieren. Da die durch SEQ ID NO:1 kodierte Desaturase zudem keine besondere Eigenschaften oder Vorteile zu besitzen scheint, kann Anspruch 22 nicht als erfinderisch im Sinne des Artikels 33(3) PCT angesehen werden.
- 2.2 Verglichen mit den Herstellungsverfahren für Fettsäuren/Triglyceride aus D1-D5 unterscheidet sich der Gegenstand des **Anspruchs 13** nur dadurch, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an Calendulasäure aufweisen. Obwohl die Erhöhung des Calendulasäure-Gehaltes im Stand der Technik nicht



explizit offenbart zu sein scheint, wäre eine solche Erhöhung für den Fachmann naheliegend, weil Herstellungsverfahren für derartige konjugierte Fettsäuren allgemein bekannt ist (siehe Punkt V-1.5. oben) und weil die kommerzielle Bedeutung der Calendulasäure aus dem Stand der Technik ebenfalls bekannt ist (siehe z.B. D6 und D11). Der Gegenstand des Anspruchs 13 scheint daher ebenfalls nicht auf erfinderischer Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) zu beruhen.

3. INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden **Ansprüche 6-7** (soweit sie sich auf Menschen beziehen) gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf den menschlichen Körper gerichtet sind, nicht als patentierbar an (Regel 23e(1) EPÜ).

4. P,X-DOKUMENTE

Die vorliegende Internationale Patentanmeldung beansprucht zu Recht die Priorität einer früherer Anmeldung. Die im Internationalen Recherchenbericht genannten "P,X"-Dokumente, die nach dem Prioritätsdatum, aber vor dem Anmeldedatum der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurden, sind daher für die vorliegende Anmeldung nicht relevant (Regel 64.1 b) ii) PCT).

PUNKT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 00 11176 A	02.03.00	16.08.99	20.08.98
EP-A-0 945 514	29.09.99	26.03.98	---
WO 01 12800 A	22.02.01	15.08.00	16.08.99



1. Da die vorliegende Internationale Patentanmeldung zu Recht die Priorität einer früheren Patentanmeldung beansprucht, gehören die ersten beiden der in diesem Abschnitt genannten Patentanmeldungen (im Internationalen Recherchenbericht als "P,X"-Dokumente genannt) für die vorliegende Internationale Patentanmeldung nicht zum Stand der Technik (Regel 64.1 PCT). In der Nationalen bzw. Regionalen Phase der vorliegenden Anmeldung können die genannten Dokumente jedoch zum relevanten Stand der Technik gehören.
2. Die dritte der oben genannten Patentanmeldungen (im Internationalen Recherchenbericht als "E"-Dokument genannt) wurde erst nach dem Anmeldedatum der vorliegenden Patentanmeldung veröffentlicht, besitzt jedoch ein Prioritätsdatum vor dem Prioritätsdatum der vorliegenden Anmeldung. In der Nationalen bzw. Regionalen Phase der vorliegenden Anmeldung kann dieses Dokumente daher relevant sein.

PUNKT VIII:

1. **Anspruch 1** ist unklar im Sinne des Artikels 6 PCT, weil der Ausdruck "mindestens 75% Homologie auf Aminosäureebene" nicht eindeutig ist, da nicht ersichtlich ist, was unter die "Homologie" zu verstehen ist. Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß der Begriff "Homologie" nicht identisch ist zum Begriff "Identität", sondern auch Ähnlichkeiten von Aminosäuren berücksichtigt.
2. Der in **Anspruch 1** benutzte Ausdruck "wesentlich reduziert" ist vage und unklar und läßt den Leser über das beanspruchte Ausmaß der Reduktion im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
3. Die **Ansprüche 10, 12-13, 16 und 18** sind unklar im Sinne des Artikels 6 PCT, weil der Ausdruck "mit einem erhöhten Gehalt an [...]" nicht klarstellt, im Vergleich wozu der Gehalt erhöht ist.



4. Der in **Anspruch 20** benutzte Ausdruck "Fragment" erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT, weil der beanspruchte Schutzzumfang nicht klar ist, solange die Mindestlänge dieses "Fragments" nicht angegeben ist. Da ein einzelnes Nukleotid ein "Fragment" einer Nukleinsäure darstellt, wird der Gegenstand des Anspruchs 20 durch jedes Dokument vorweggenommen, das genomisches Homologie-Screening offenbart.

5. **Anspruch 22** ist unklar im Sinne des Artikels 6 PCT, weil die in der allgemeinen Struktur gezeigte Verbindung nur dann eine "Fettsäure" darstellt, wenn $R^1=H$ ist.

Patentansprüche

1. Is lierte Nukl insäuresequ nz, di für ein Polyp ptid mit
5 Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1
dargestellten Sequenz,
 - 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des
degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1
dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
 - 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure-
sequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2
dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens
75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß
die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich
20 reduziert ist.
2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz
gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in
25 SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz
gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem
oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 30 5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1
oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
6. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz
35 gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt
gemäß Anspruch 4.
7. Organismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus
um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.
- 40 8. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht
funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein
funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt
gemäß Anspruch 4.

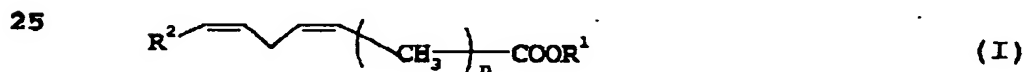
45

2

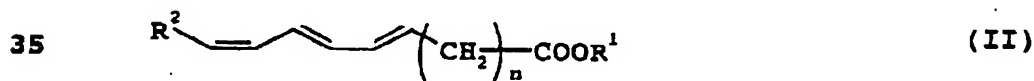
9. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
5
10. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren; dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
10
15
11. Verfahren zur Herstellung von gesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
20
12. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
25
30
13. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an Calendulasäure aufweisen.
35
14. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen Mikroorganismus handelt.
40
15. Ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9.
16. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10.
45

3

17. Gesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 11.
18. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 12.
19. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 4 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
20. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
21. Verwendung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 15 oder 17 oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 16 oder 18 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika.
22. Enzym, das durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 codiert wird und das eine Fettsäure der allgemeinen Struktur I,

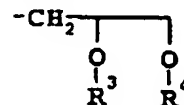


- 30 die zwei durch eine Methylengruppe voneinander getrennte Doppelbindungen aufweist, zu einer dreifach ungesättigten Fettsäure der allgemeinen Struktur II



- 40 umgesetzt, wobei die drei Doppelbindungen der Fettsäure in Konjugation sind und wobei die Substituenten und Variablen in den Verbindungen der allgemeinen Struktur I und II folgende Bedeutung haben:

- 45 R^1 = Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C_1 - C_{10} -Alkyl-,



4

R^2 = substituiert s od r unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes C_1 - C_9 -Alkyl-

5 R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C_1 - C_{22} -Alkylcarbonyl- oder Phospho-,

n = 1 bis 14

10

15

20

25

30

35

40

45

GEAENDERTES BLATT

Empfangsbeleg 01.09.01 10.07



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 May 2001 (29.05.01)	
International application No. PCT/EP00/08222	Applicant's or agent's file reference 0050/050669
International filing date (day/month/year) 23 August 2000 (23.08.00)	Priority date (day/month/year) 01 September 1999 (01.09.99)
Applicant FEUSSNER, Ivo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 24 March 2001 (24.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Charlotte ENGER Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT
D-67056 Ludwigshafen
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 12 June 2001 (12.06.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 0050/050669	
International application No. PCT/EP00/08222	International filing date (day/month/year) 23 August 2000 (23.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address PEITZSCH, Nicola W.-Seelenbinder-Strasse 34 D-39118 Magdeburg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address PEITZSCH, Nicola Vor dem Gröperntor 12 D-06484 Quedlinburg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer F. Baechler Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. März 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/16362 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
9/02, C07K 14/415, C12N 1/19, A01H 5/00, C11B 1/00,
C11C 1/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08222

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. August 2000 (23.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 41 609.5 1. September 1999 (01.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FEUSSNER, Ivo
[DE/DE]; Schleiermacherstrasse 9, D-06114 Halle (DE).
HORNUNG, Ellen [DE/DE]; Severinweg 3, D-06484
Quedlinburg (DE). FRITSCHKE, Kathrin [DE/NL]; Ro-
denburgstraat 65, D-6811 HN Arnhem (NL). PEITZSCH,
Nicola [DE/DE]; Vor dem Gröperntor 12, D-06484
Quedlinburg (DE). RENZ, Andreas [DE/DE]; Hein-
rich-von-Kleist-Strasse 6, D-67117 Limburgerhof (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 7. September 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: FATTY ACID DESATURASE GENE FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: FETTSÄURE-DESATURASE-GEN AUS PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing unsaturated or saturated fatty acids and to a method for producing triglycerides with an increased unsaturated or saturated fatty acid content. The invention also relates to a nucleic acid sequence and a nucleic acid construct, a vector and organisms containing at least one nucleic acid sequence or a nucleic acid construct. Finally, the invention relates to saturated or unsaturated fatty acids and triglycerides with an increased unsaturated or saturated fatty acid content and to their use.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Nukleinsäuresequenz; ein Nukleinsäurekonstrukt, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Nukleinsäurekonstrukt. Ausserdem betrifft die Erfindung gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

WO 01/16362 A3

8

9

10

11

12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C07K14/415 C12N1/19 A01H5/00
C11B1/00 C11C1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A01H C11B C11C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 46762 A (GREEN ALLAN ;SINGH SURINDER (AU); COMMW SCIENT IND RES ORG (AU); S) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document ---	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	WO 97 37033 A (BAFOR MAUREEN ;BANAS ANTONI (PL); DAHLQVIST ANDERS (SE); GUMMESON) 9 October 1997 (1997-10-09) the whole document ---	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	WO 98 56922 A (DU PONT ;HITZ WILLIAM D (US)) 17 December 1998 (1998-12-17) see SEQ ID NOS:1-4 --- -/--	1,2, 4-12, 14-16, 19,20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2001

Date of mailing of the international search report

26/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/08222

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 850 026 A (DEBONTE LORIN R ET AL) 15 December 1998 (1998-12-15) see SEQ ID NOS:1-6 ---	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	WO 94 11516 A (DU PONT ;LIGHTNER JONATHAN EDWARD (US); OKULEY JOHN JOSEPH (US)) 26 May 1994 (1994-05-26) see SEQ ID NOS:2,4,6,8,12 ---	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	MEIER ZU BEERENTRUP H ET AL: "CALENDULA AND CORIANDRUM NEW POTENTIAL OIL CROPS FOR INDUSTRIAL USES" FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, vol. 89, no. 6, 1987, pages 227-230, XP002162405 ISSN: 0931-5985 the whole document ---	15,16
X	CROMBIE L ET AL: "THE BIOSYNTHESIS OF CALENDIC-ACID OCTADECA-8E 10E 12Z-TRIENOIC-ACID BY DEVELOPING MARIGOLD SEEDS ORIGINS OF E E Z AND Z E Z CONJUGATED TRIENE ACIDS IN HIGHER PLANTS" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY PERKIN TRANSACTIONS I, no. 11, 1985, pages 2425-2434, XP000973290 ISSN: 0300-922X the whole document ---	15,16
X	LIU LINSSEN ET AL: "In vivo studies of the biosynthesis of alpha-eleostearic acid in the seed of Momordica charantia L." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 113, no. 4, 1997, pages 1343-1349, XP000973396 ISSN: 0032-0889 the whole document ---	15,16
X	WO 97 35987 A (PIONEER HI BRED INT) 2 October 1997 (1997-10-02) the whole document ---	17,18
X	GUNSTONE, F.D., ET AL.: "The Lipid Handbook: second edition" 1994, CHAPMAN & HALL, LONDON XP002162924 page 7 -page 8 page 51 page 109 --- -/--	15,16,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08222

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1998 DHAR P ET AL: "Nutritional characteristics of oil containing conjugated octadecatrienoic fatty acid." Database accession no. PREV199900002659 XP002162410 abstract & ANNALS OF NUTRITION & METABOLISM, vol. 42, no. 5, 1998, pages 290-296, ISSN: 0250-6807</p>	21
X	<p>GB 2 323 031 A (SCOTIA HOLDINGS PLC) 16 September 1998 (1998-09-16) page 3, line 1 - line 2</p>	21
P,X	<p>FRITSCH KATHRIN ET AL: "Isolation and characterization of a calendic acid producing (8,11)-linoleoyl desaturase." FEBS LETTERS, vol. 462, no. 3, 3 December 1999 (1999-12-03), pages 249-253, XP000941865 ISSN: 0014-5793 the whole document -& DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AJ245938, 22 December 1999 (1999-12-22) FUESSNER, I.: "Calendula officinalis partial mRNA for (8,11)-linoleoyl desaturase (des8.11gene)" XP002162411 abstract</p>	1-9, 13-15,22
P,X	<p>WO 00 11176 A (CAHOON EDGAR BENJAMIN ;HITZ WILLIAM DEAN (US); DU PONT (US); RIPP) 2 March 2000 (2000-03-02)</p> <p>siehe SEQ ID NO:6</p>	1,2, 4-10, 14-16, 19-22
P,X	<p>CAHOON EDGAR B ET AL: "Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12935-12940, XP002162407 Oct. 26, 1999 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	1,2, 4-10, 14-16, 19-22

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08222

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 0 945 514 A (DU PONT) 29 September 1999 (1999-09-29) the whole document ---	1-10, 14-16
E	WO 01 12800 A (CAHOON EDGAR BENJAMIN ;HITZ WILLIAM DEAN (US); DU PONT (US); RIPP) 22 February 2001 (2001-02-22) the whole document ---	1,2, 4-10, 14-16, 19-22
T	CAHOON, B, ET AL.: "Formation of Conjugated Delta 8,Delta 10-Double Bonds by Delta 12-Oleic-acid Desaturase-related Enzymes. BIOSYNTHETIC ORIGIN OF CALENDIC ACID" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, 2001, pages 2637-2643, XP000990245 the whole document ---	1-22
A	HAMBERG MATS: "Metabolism of 6,9,12-octadecatrienoic acid in the red alga Lithothamnion corallioides: Mechanism of formation of a conjugated tetraene fatty acid." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 188, no. 3, 1992, pages 1220-1227, XP000941893 ISSN: 0006-291X the whole document -----	22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08222

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846762	A	22-10-1998	AU 6813598 A BR 9808676 A CN 1257541 T EP 0975765 A PL 336292 A HU 0002690 A	11-11-1998 11-07-2000 21-06-2000 02-02-2000 19-06-2000 28-11-2000
WO 9737033	A	09-10-1997	AU 720765 B AU 1818797 A CA 2250234 A CZ 9803135 A EP 0889970 A JP 2000507450 T NO 984448 A PL 329175 A	08-06-2000 22-10-1997 09-10-1997 12-05-1999 13-01-1999 20-06-2000 30-11-1998 15-03-1999
WO 9856922	A	17-12-1998	US 5846784 A AU 7958698 A BR 9815537 A EP 0977866 A	08-12-1998 30-12-1998 16-01-2001 09-02-2000
US 5850026	A	15-12-1998	US 6063947 A	16-05-2000
WO 9411516	A	26-05-1994	AU 5407594 A AU 6984198 A CA 2149223 A EP 0668919 A JP 8503364 T	08-06-1994 01-10-1998 26-05-1994 30-08-1995 16-04-1996
WO 9735987	A	02-10-1997	US 6084164 A AU 727803 B AU 2249997 A BG 102859 A CA 2250091 A EP 0889962 A SK 132098 A TR 9801897 T	04-07-2000 21-12-2000 17-10-1997 31-05-1999 02-10-1997 13-01-1999 13-04-1999 21-12-1998
GB 2323031	A	16-09-1998	AU 6408598 A WO 9840059 A ZA 9801668 A	29-09-1998 17-09-1998 11-09-1998
WO 0011176	A	02-03-2000	AU 5674699 A	14-03-2000
EP 0945514	A	29-09-1999	NONE	
WO 0112800	A	22-02-2001	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12N15/82 C11B1/00	C12N9/02 C11C1/00
C07K14/415	C12N1/19	A01H5/00
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 C12N C07K A01H C11B C11C		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 46762 A (GREEN ALLAN ;SINGH SURINDER (AU); COMMW SCIENT IND RES ORG (AU); S) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) das ganze Dokument	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	WO 97 37033 A (BAFOR MAUREEN ;BANAS ANTONI (PL); DAHLQVIST ANDERS (SE); GUMMESON) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) das ganze Dokument	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	WO 98 56922 A (DU PONT ;HITZ WILLIAM D (US)) 17. Dezember 1998 (1998-12-17) siehe SEQ ID NOS:1-4	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
15. März 2001		26/03/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Maddox, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 850 026 A (DEBONTE LORIN R ET AL) 15. Dezember 1998 (1998-12-15) siehe SEQ ID NOS:1-6 ---	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	WO 94 11516 A (DU PONT ;LIGHTNER JONATHAN EDWARD (US); OKULEY JOHN JOSEPH (US)) 26. Mai 1994 (1994-05-26) siehe SEQ ID NOS:2,4,6,8,12 ---	1,2, 4-12, 14-16, 19,20
X	MEIER ZU BEERENTRUP H ET AL: "CALENDULA AND CORIANDRUM NEW POTENTIAL OIL CROPS FOR INDUSTRIAL USES" FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, Bd. 89, Nr. 6, 1987, Seiten 227-230, XP002162405 ISSN: 0931-5985 das ganze Dokument ---	15,16
X	CROMBIE L ET AL: "THE BIOSYNTHESIS OF CALENDIC-ACID OCTADECA-8E 10E 12Z-TRIENOIC-ACID BY DEVELOPING MARIGOLD SEEDS ORIGINS OF E E Z AND Z E Z CONJUGATED TRIENE ACIDS IN HIGHER PLANTS" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY PERKIN TRANSACTIONS I, Nr. 11, 1985, Seiten 2425-2434, XP000973290 ISSN: 0300-922X das ganze Dokument ---	15,16
X	LIU LINSSEN ET AL: "In vivo studies of the biosynthesis of alpha-eleostearic acid in the seed of Momordica charantia L." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 113, Nr. 4, 1997, Seiten 1343-1349, XP000973396 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument ---	15,16
X	WO 97 35987 A (PIONEER HI BRED INT) 2. Oktober 1997 (1997-10-02) das ganze Dokument ---	17,18
X	GUNSTONE, F.D., ET AL.: "The Lipid Handbook: second edition" 1994, CHAPMAN & HALL, LONDON XP002162924 Seite 7 -Seite 8 Seite 51 Seite 109 --- -/--	15,16,21

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1998 DHAR P ET AL: "Nutritional characteristics of oil containing conjugated octadecatrienoic fatty acid." Database accession no. PREV199900002659 XP002162410 Zusammenfassung & ANNALS OF NUTRITION & METABOLISM, Bd. 42, Nr. 5, 1998, Seiten 290-296, ISSN: 0250-6807</p>	21
X	<p>GB 2 323 031 A (SCOTIA HOLDINGS PLC) 16. September 1998 (1998-09-16) Seite 3, Zeile 1 - Zeile 2</p>	21
P,X	<p>FRITSCH KATHRIN ET AL: "Isolation and characterization of a calendic acid producing (8,11)-linoleoyl desaturase." FEBS LETTERS, Bd. 462, Nr. 3, 3. Dezember 1999 (1999-12-03), Seiten 249-253, XP000941865 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument -& DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AJ245938, 22. Dezember 1999 (1999-12-22) FUESSNER, I.: "Calendula officinalis partial mRNA for (8,11)-linoleoyl desaturase (des8.11gene)" XP002162411 Zusammenfassung</p>	1-9, 13-15,22
P,X	<p>WO 00 11176 A (CAHOON EDGAR BENJAMIN ;HITZ WILLIAM DEAN (US); DU PONT (US); RIPP) 2. März 2000 (2000-03-02) siehe SEQ ID NO:6</p>	1,2, 4-10, 14-16, 19-22
P,X	<p>CAHOON EDGAR B ET AL: "Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 22, 26. Oktober 1999 (1999-10-26), Seiten 12935-12940, XP002162407 Oct. 26, 1999 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p>	1,2, 4-10, 14-16, 19-22

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EP 0 945 514 A (DU PONT) 29. September 1999 (1999-09-29) das ganze Dokument ---	1-10, 14-16
E	WO 01 12800 A (CAHOON EDGAR BENJAMIN ;HITZ WILLIAM DEAN (US); DU PONT (US); RIPP) 22. Februar 2001 (2001-02-22) das ganze Dokument ---	1,2, 4-10, 14-16, 19-22
T	CAHOON, B, ET AL.: "Formation of Conjugated Delta 8,Delta 10-Double Bonds by Delta 12-Oleic-acid Desaturase-related Enzymes. BIOSYNTHETIC ORIGIN OF CALENDIC ACID" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 276, 2001, Seiten 2637-2643, XP000990245 das ganze Dokument ---	1-22
A	HAMBERG MATS: "Metabolism of 6,9,12-octadecatrienoic acid in the red alga Lithothamnion corallioides: Mechanism of formation of a conjugated tetraene fatty acid." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 188, Nr. 3, 1992, Seiten 1220-1227, XP000941893 ISSN: 0006-291X das ganze Dokument -----	22

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08222

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846762 A	22-10-1998	AU 6813598 A BR 9808676 A CN 1257541 T EP 0975765 A PL 336292 A HU 0002690 A	11-11-1998 11-07-2000 21-06-2000 02-02-2000 19-06-2000 28-11-2000
WO 9737033 A	09-10-1997	AU 720765 B AU 1818797 A CA 2250234 A CZ 9803135 A EP 0889970 A JP 2000507450 T NO 984448 A PL 329175 A	08-06-2000 22-10-1997 09-10-1997 12-05-1999 13-01-1999 20-06-2000 30-11-1998 15-03-1999
WO 9856922 A	17-12-1998	US 5846784 A AU 7958698 A BR 9815537 A EP 0977866 A	08-12-1998 30-12-1998 16-01-2001 09-02-2000
US 5850026 A	15-12-1998	US 6063947 A	16-05-2000
WO 9411516 A	26-05-1994	AU 5407594 A AU 6984198 A CA 2149223 A EP 0668919 A JP 8503364 T	08-06-1994 01-10-1998 26-05-1994 30-08-1995 16-04-1996
WO 9735987 A	02-10-1997	US 6084164 A AU 727803 B AU 2249997 A BG 102859 A CA 2250091 A EP 0889962 A SK 132098 A TR 9801897 T	04-07-2000 21-12-2000 17-10-1997 31-05-1999 02-10-1997 13-01-1999 13-04-1999 21-12-1998
GB 2323031 A	16-09-1998	AU 6408598 A WO 9840059 A ZA 9801668 A	29-09-1998 17-09-1998 11-09-1998
WO 0011176 A	02-03-2000	AU 5674699 A	14-03-2000
EP 0945514 A	29-09-1999	KEINE	
WO 0112800 A	22-02-2001	KEINE	

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. März 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/16362 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08222
- (22) Internationales Anmeldedatum:
23. August 2000 (23.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 41 609.5 1. September 1999 (01.09.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FEUSSNER, Ivo [DE/DE]; Schleiermacherstrasse 9, D-06114 Halle (DE). HORNUNG, Ellen [DE/DE]; Thomasiusstrasse 44, D-06110 Halle (DE). FRITSCH, Kathrin [DE/NL]; Rodenburgstraat 65, D-6811 HN Arnhem (NL). PEITZSCH, Nicola [DE/DE]; W.-Seelenbinder-Strasse 34, D-39118 Magdeburg (DE). RENZ, Andreas [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Strasse 6, D-67117 Limburgerhof (DE).
- Veröffentlicht:**
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: FATTY ACID DESATURASE GENE FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: FETTSÄURE-DESATURASE-GEN AUS PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing unsaturated or saturated fatty acids and to a method for producing triglycerides with an increased unsaturated or saturated fatty acid content. The invention also relates to a nucleic acid sequence and a nucleic acid construct, a vector and organisms containing at least one nucleic acid sequence or a nucleic acid construct. Finally, the invention relates to saturated or unsaturated fatty acids and triglycerides with an increased unsaturated or saturated fatty acid content and to their use.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Nukleinsäuresequenz; ein Nukleinsäurekonstrukt, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Nukleinsäurekonstrukt. Ausserdem betrifft die Erfindung gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

WO 01/16362 A2

Fettsäure-Desaturase-Gen aus Pflanzen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Nukleinsäuresequenz; ein Nukleinsäurekonstrukt, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Nukleinsäurekonstrukt. Außerdem betrifft die Erfindung gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie *Mortierella* oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie werden aber auch vorteilhaft aus Tieren wie Fischen gewonnen. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Sie finden in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Besonders wertvolle und gesuchte ungesättigte Fettsäuren sind die sogenannten konjugierten ungesättigten Fettsäuren wie die konjugierte Linolsäure. Für konjugierte Fettsäuren sind eine Reihe positiver Effekte nachgewiesen worden, so reduziert die Verabreichung von konjugierter Linolsäure das Körperfett in Mensch und Tier bzw. erhöht den Futterumsatz in Körpergewicht bei Tieren

(WO 94/16690, WO 96/06605, WO 97/46230, WO 97/46118). Durch Gabe von konjugierter Linolsäure lassen sich auch beispielsweise Allergien (WO 97/32008) oder Krebs positiv (Banni et al., Carcinogenesis, Vol. 20, 1999: 1019 - 1024, Thompson et al., Cancer, 5 Res., Vol. 57, 1997: 5067 - 5072) beeinflussen.

Die chemische Herstellung konjugierter Fettsäuren beispielsweise Calendulasäure oder konjugierter Linolsäure wird in US 3,356,699 und US 4,164,505 beschrieben. Calendulasäure kommt natürlich
10 in *Calendula officinalis* vor (Ul'chenko et al., Chemistry of Natural Compounds, 34, 1998: 272 - 274). Konjugierte Linolsäure findet sich beispielsweise in Rindfleisch (Chin et al., Journal of Food Composition and Analysis, 5, 1992: 185 - 197). Biochemische Untersuchungen zur Synthese von Calendulasäure sind in Crom-
15 bie et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 15, 1984: 953 - 955 und J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 1985: 2425 - 2434 zu finden.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt Gene, die an der Synthese von
20 Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase; in
25 WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712 und WO 96/21022 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144 - 20149, Wada et al.,
30 Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649 - 659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al.,
35 Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141 - 12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777 - 792).

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34,
40 1999: 649 - 659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611 - 614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrum zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich
45 aber, daß die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark

nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die
5 für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen diese und speziell konjugierte ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren und in einem technischen Maßstab herzustellen.

10 Es bestand daher die Aufgabe weitere Desaturasen für die Synthese ungesättigter konjugierter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch eine isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten
20 Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 75 %
25 Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe des
30 von SEQ ID NO: 1 kodierten Enzyms oder dessen enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die dieselben enzymatischen Reaktionen wie das von SEQ ID NO:1 kodierte Enzym katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung ungesättigter konjugierte Fettsäuren. Unter ungesättigten Fettsäuren sind im folgenden einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu verstehen, deren Doppelbindungen konjugiert oder
35 nicht konjugiert sein können. Die in SEQ ID NO:1 genannte Sequenz kodiert für eine neue unbekannte Desaturase, die an der Synthese von Calendulasäure in Calendula officinalis beteiligt ist. Das
40 Enzym setzt (9Z,12Z)Octadecadien/Linolsäure zu (8E,10E,12Z) Octadecakonjugierten/Calendulasäure um. Im folgenden wird sie als Calendulasäure-Desaturase bezeichnet.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder Fragmente davon
45 können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* oder *Osteospermum hyoseroides*, Algen, Protozoen wie Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

5

Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID No.1 genannten Sequenz beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 75 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders
10 bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151 - 153). Die von der genannten Nukleinsäure
15 abgeleitete Aminosäuresequenz ist Sequenz SEQ ID No.2 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.
20

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von der in SEQ ID NO:1 beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-
25 Technik aus anderen Eukaryonten wie oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Desaturasegenen in dem Fachmann bekannterweise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch
30 längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet
35 werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa
45 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungs-

- bedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielsweise kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No.1 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.
- Außerdem sind unter Homologe der Sequenz SEQ ID No.1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.
- Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.
- Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen

anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Vorteilhaft kann das Calendulasäure-Desaturase-Gen im erfindungs-
5 gemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden.

Unter den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind Proteine zu verstehen, die eine in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäure-
10 sequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteins erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind
15 alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt
20 werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen
25 miteinander kombiniert werden.

Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment ist die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz, Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder
30 nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression
35 der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die
40 Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz oder deren Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so
45 mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch

eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Das Calendulasäure-Desaturase-Gen kann in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

- Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI^q-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, λ -*P_R*- oder im λ -*P_L*-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren wie *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], *PRP1* [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *STLS1*, *B33*, *nos* oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Weitere vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der *ST-LSI* Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus *Glycine max* (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 beschrieben. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Fettbiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der *usp*-Promotor, der *LEB4*-Promotor, der *Phaseolin*-Promotor oder der *Napin*-Promotor.

- Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- Im Nukleinsäurefragment (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie das erfindungsgemäße Desaturase-Gen liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Bio-

synthesegene vorteilhaft der Fettsäure- und Lipidbiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen, 5 die β -Ketoacyl-ACP-Synthasen, die Acyltransferasen wie die Diacylglycerolacyltransferase, die Glycerol-3-phosphatacyltransferase oder die Lysophosphatidsäureacyltransferase oder die β -Ketoacyl-ACP-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet bevorzugt das $\Delta 12$ -Desaturasegen.

10 Das Nukleinsäurefragment wird zur Expression in einem Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA 15 inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* 20 pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 μ M, pAG-1, YE_p6, YE_p13 oder pEMBL_{Ye}23 oder in Pflanzen pLGV23, pG_Hlac⁺, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der 25 möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular 30 Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie 35 SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

40 Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz und/oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragments.

45 Zur Erhöhung der Genkopienzahl können die Nukleinsäuresequenzen oder homologe Gene, beispielsweise in ein Nukleinsäurefragment bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise die den jeweiligen Genen zugeordnete, regulatorische Gensequenzen oder

analog wirkende Promotoraktivität enthält. Insbesondere werden solche regulatorische Sequenzen verwendet, die die Genexpression verstärken.

- 5 Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurefragment zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

10

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß

- 15 es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der

- 20 regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

25

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Genkonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus

30 integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurefragment als Vektor oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz bestehen.

- Vorteilhafterweise wird die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz
- 35 zusammen mit mindestens einem Reportergen in ein Nukleinsäurekonstrukt kloniert, das in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Bei-
- 40 spielhaft seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das β -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-
- 45 phosphat-Phosphatasegen, das β -Glucuronidase-Gen, β -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinat) Resistenz-Gen

genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transkriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

5

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- 10 Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren
15 gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Wirtsorganismus enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukts.

20

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des Nukleinsäurekonstrukts oder des Vektors in Organismen beispielsweise Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

25

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.

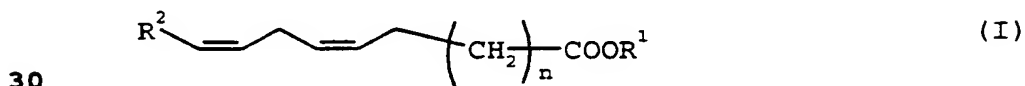
35

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen
40 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer.

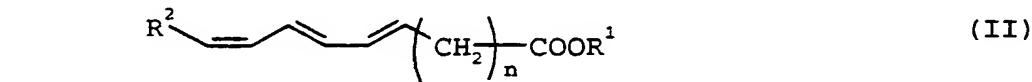
- 45 Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und

- R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben.
- 5
- 10 Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder Kulturpflanzen, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs,
- 15 Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- 20 Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.
- 25 Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, das Nukleinsäurekonstrukt oder den Vektor eignen sich prinzipiell alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien
- 30 Pflanzen wie *Arabidopsis*, *Asteraceae* wie *Calendula* oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie
- 35 die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Flachs,
- 40 Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, *Calendula*, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Flachs, Sonnenblume, *Calendula* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere beispielsweise *Caeno-*
- 45 *rhabditis elegans*.

- Eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung sind wie oben beschrieben transgene Pflanzen, die eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäure oder ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt enthalten. Unter nicht funktionell ist zu verstehen, daß kein enzymatisch aktives Protein mehr synthetisiert wird, da das natürliche Gen inaktiviert wurde. Außerdem ist unter nicht funktionellen Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukten auch eine sogenannte Antisense-DNA zu verstehen, die zu transgenen Pflanzen führt, die eine Reduktion der enzymatischen Aktivität oder keine enzymatischen Aktivität aufweisen. Mit Hilfe der Antisense-Technik, speziell wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz mit anderen Fettsäuresynthesegenen in der Antisense-DNA kombiniert wird, ist es möglich Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren bzw. gesättigte Fettsäuren zu synthetisieren. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren Kulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.
- 20 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur Herstellung von transgenen Pflanzen gehört deshalb auch zu den Erfindungsgegenständen.
- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Enzym, das eine Fettsäure der allgemeinen Struktur I,

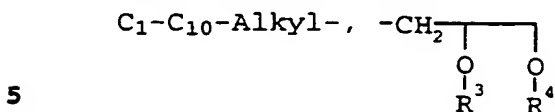


- die zwei durch eine Methylengruppe voneinander getrennte Doppelbindungen aufweist, zu einer dreifach ungesättigten Fettsäure der allgemeinen Struktur II
- 35



- umsetzt, wobei die drei Doppelbindungen der Fettsäure in Konjugation sind und wobei die Substituenten und Variablen in den Verbindungen der allgemeinen Struktur I und II folgende Bedeutung haben:
- 45

R¹ = Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigte oder gesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₁₀-Alkyl-,

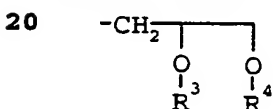


R² = substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes C₁-C₉-Alkyl-

10 R³ und R⁴ unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₂₂-Alkylcarbonyl- oder Phospho-,

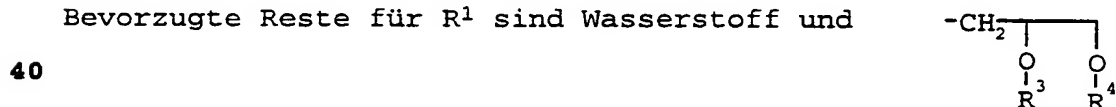
15 n = 1 bis 14, bevorzugt 1 bis 8, besonders bevorzugt 4 bis 6, ganz besonders bevorzugt 6.

R¹ bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₁₀-Alkyl-, oder



25 Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C₁-C₁₀-Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, 30 n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder 35 n-Decyl genannt.

Bevorzugte Reste für R¹ sind Wasserstoff und



45 R² bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes C₁-C₉-Alkyl-.

- Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C₁-C₉-Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl oder n-Nonyl genannt. Bevorzugt ist C₁-C₅-Alkyl, besonders bevorzugt ist C₅-Alkyl.
- 15 R³ und R⁴ bezeichnen unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C₁-C₂₂-Alkylcarbonyl- oder Phospho-.
- 20 C₁-C₂₂-Alkylcarbonyl wie Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n Propylcarbonyl, 1 Methylethyl carbonyl, n Butylcarbonyl, 1 Methylpropylcarbonyl, 2 Methylpropylcarbonyl, 1,1 Dimethylethylcarbonyl, n Pentylcarbonyl, 1 Methylbutylcarbonyl, 2 Methylbutylcarbonyl,
- 25 3 Methylbutylcarbonyl, 1,1 Dimethylpropylcarbonyl, 1,2 Dimethylpropylcarbonyl, 2,2 Dimethylpropylcarbonyl, 1 Ethylpropylcarbonyl, n Hexylcarbonyl, 1 Methylpentylcarbonyl, 2 Methylpentylcarbonyl, 3 Methylpentylcarbonyl, 4 Methylpentylcarbonyl, 1,1 Dimethylbutylcarbonyl,
- 30 1,2 Dimethylbutylcarbonyl, 1,3 Dimethylbutylcarbonyl, 2,2 Dimethylbutylcarbonyl, 2,3 Dimethylbutylcarbonyl, 3,3 Dimethylbutylcarbonyl, 1 Ethylbutylcarbonyl, 2 Ethylbutylcarbonyl, 1,1,2 Trimethylpropylcarbonyl, 1,2,2 Trimethylpropylcarbonyl, 1 Ethyl 1 methylpropylcarbonyl und
- 35 1 Ethyl 2 methylpropylcarbonyl, Heptylcarbonyl, Nonylcarbonyl, Decylcarbonyl, Undecylcarbonyl, n-Dodecylcarbonyl, n-Tridecylcarbonyl, n-Tetradecylcarbonyl, n-Pentadecylcarbonyl, n-Hexadecylcarbonyl, n-Heptadecylcarbonyl, n-Octadecylcarbonyl, n-Nona-decylcarbonyl oder n-Eicosylcarbonyl.
- 40 Bevorzugte Substituenten für R³ und R⁴ sind gesättigtes oder ungesättigtes C₁₆-C₂₂-Alkylcarbonyl.
- Als Substituenten der genannten Reste seien beispielsweise
- 45 Halogen wie Fluor oder Chlor, Alkyl oder Hydroxyl genannt.

Bei der Umsetzung mit dem erfindungsgemäßen Enzym wird eine Doppelbindung in die Fettsäure eingeführt und eine Doppelbindung verschoben, so daß die an der Reaktion beteiligten drei Doppelbindungen in Konjugation liegen. Weiterhin wird eine Doppelbindung isomerisiert (von cis zu trans).

Das Enzym (= Calendulasäure-Desaturase) katalysiert vorteilhaft die Umsetzung von Linolsäure (18:2, 9Z,12Z) zu Calendulasäure (18:3, 8E,10E,12Z). Das Enzym führt eine trans-Doppelbindung an Position C8 ein und bewirkt die spezifische Verschiebung einer cis-Doppelbindung in Position C9 zu einer trans-Doppelbindung in Position C10, wobei die Isomerisierung regiospezifisch erfolgt. Ein möglicher hypothetischer Reaktionsmechanismus ist in Fig. 1 dargestellt. Nach einer Deprotonierung an C8 der Linolsäure und einer Umlagerung des Radikals nach C10 kommt es im Zuge einer Wasserabspaltung zur Deprotonierung an C11 und damit zur Bildung von Calendulasäure. Gleichzeitig wird gebundenes Fe IV zu Fe III reduziert. Fig. 1 gibt den hypothetischen Mechanismus für (8,11)-Linoleoyl Desaturase (Calendulasäure-Desaturase) modifiziert nach Svatos, A et al. (Insect Biochemistry and Molecular Biology 29,1999:225-232) basierend auf dem vorgeschlagenen Katalysemechanismus für $\Delta 9$ Desaturase aus Ricinus (Lindqvist, Y et al., EMBO Journal 15, 1996:4081-4092) wieder. Als Substrate kommen weiterhin auch die 6Z,9Z,12Z, 18:3-Fettsäure und die 9Z,12Z,15Z, 18:3-Fettsäure in Frage, die dann zu 6Z,8E,10E,12Z- bzw. 8E,10E,12Z,15Z-Fettsäuren umgesetzt werden.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen bevorzugt Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.

Auch ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert, gehört zu den Erfindungsgegenständen.

Beide Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren wie Calendulasäure.

- 5 Weitere erfindungsgemäße Gegenstände sind ein Verfahren zur Herstellung von gesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein nicht funktionelles erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produ-
10 zierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht, das in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenen Fettsäuren freisetzt und ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht
15 funktionelle oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein nicht funktionelles erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert. Für diese beiden Verfahren wird die
20 sogenannte Antisense-Technologie verwendet (siehe oben) bzw. die natürlichen Synthesegene inaktiviert.

- Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume,
25 Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodium* genannt. Bevor-
30 zugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Flachs, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*,
35 besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Flachs, Sonnenblume, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*.

- Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. ge-
40 züchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, eine Phosphatquelle wie Kaliumhydrogenphosphat, Spurenelemente wie Ei-
45 sen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 °C und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei

kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht wird der pH reguliert. Es ist auch eine Anzucht ohne pH-Regulation möglich. Die Anzucht kann im batch, semi batch oder kontinuierlich erfolgen. Nähr-
5 stoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikon-
tinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.

Pflanzen werden nach Transformation zunächst wie oben beschrieben regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. ange-
10 baut.

Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher-
weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst
aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide
15 werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare
Lösungsmittel wie Hexan oder polaren wie Ethanol, Isopropanol
oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamy-
lalkohol bei Temperaturen zwischen 0 °C bis 80 °C, bevorzugt zwi-
schen 20 °C bis 50 °C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel
20 mit einem Überschuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise
einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösung-
mittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation
entfernt. Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO₂ erfol-
gen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise
25 über Filtration entfernt werden. Standardmethoden zur Extraktion
von Fettsäuren aus Pflanzen und Mikroorganismen werden in Bligh
et al. (Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1959: 911-917) oder Vick et
al. (Plant Physiol. 69, 1982: 1103-1108) beschrieben.

30 Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt
werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit
polaren Lösungsmitteln wie Aceton oder apolaren Lösungsmitteln
wie Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation
entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über Säulen oder an-
35 deren Techniken ist möglich.

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden
diese in üblicherweise verseift beispielsweise mit NaOH oder KOH.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte oder
gesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten
Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren, die nach
den oben genannten Verfahren hergestellt wurden sowie deren
Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter,
45 Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu werden diese den Nahrungs-

mitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert:

5

Beispiele

Über RT-PCR und RACE-Techniken wurde aus mRNA von *Calendula officinalis* eine cDNA kloniert. Bei Expression dieser cDNA in Hefe wird Linolsäure in das Octadecakonjugat Calendulasäure (8E, 10E, 12Z) umgesetzt. Es handelt sich hierbei unseres Wissens nach um die erstmalige Beschreibung einer Calendulasäure-Desaturase. Das Enzym bewirkt eine regiospezifische Verschiebung einer *cis*-Doppelbindung in Position C9 zu einer *trans*-Doppelbindung in Position C10 und führt eine neue *trans*-Doppelbindung an Position C8 ein.

Transgene Hefen und Pflanzen mit erhöhter Expression der Calendulasäure-Desaturase-cDNA weisen Calendulasäure in ihren Lipiden auf.

Beispiel 1: RNA-Isolierung aus Samen von *Calendula officinalis*

Um cDNA-Klone für Calendulasäure-Desaturase per PCR isolieren zu können, wurde RNA aus Samen von *Calendula officinalis* präpariert. Aufgrund des hohen Fettgehalts der Samen konnten hierzu keine Standardprotokolle verwendet werden, sondern es wurde die folgende Methode angewandt:

20 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zermörsert. 100 ml Extraktionspuffer I [100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 2 % (w/v) Laurylsarkosyl, 4 M Guanidiniumthiocyanat, 5 % (w/v) PVP (= Polyvinylpyrrolidon), 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol] wurden zugegeben, sofort durchmischt und homogenisiert. Die Lösung wurde in 50 ml-Gefäße überführt und für ca. 15 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 4000 g für 10-15 min wurde die oben schwimmende Fettschicht bzw. Fetttropfen abgenommen und der Überstand in frische Gefäße überführt. Es folgte eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (= PCI, 25:24:1) und eine Extraktion mit Chloroform, wobei jeweils 15 Minuten lang geschüttelt und dann abzentrifugiert wurde. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, auf ein 8 ml CsCl-Kissen (5 M CsCl) geschichtet und 18 Stunden lang bei 18 °C und 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Präzipitat kurz getrocknet. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde die RNA in einer Mischung aus 7,5 ml Extraktionspuffer II (100 ml Tris/HCl, pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA,

2 % SDS) und 10 ml PCI gelöst, 15 Minuten lang geschüttelt und abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde nach einer Chloroform-Extraktion mit dem gleichen Volumen 5 M LiCl versetzt. Die RNA-Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde
5 60 Minuten lang bei 12000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde zwei mal mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet und schließlich in 500 µl H₂O aufgenommen.

Aus der so gewonnenen Calendula-Gesamt-RNA wurde mit dem Poly-At-
10 tract-Kit (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mRNA isoliert. 1 µg dieser mRNA wurden mit der SuperscriptII reversen Transkriptase von Gibco BRL (Eggenstein) mit 200 pmol oligo-dT-Primer nach Herstellervorschrift in cDNA übersetzt und als Template in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

15

Beispiel 2 : Isolierung und Klonierung der Calendulasäure-Desaturase aus *Calendula officinalis*

Um DNA-Sequenzen aus *Calendula officinalis* zu isolieren, die für
20 eine Calendulasäure-Desaturase kodieren, wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von Aminosäure-Sequenzen der konservierten Histidin-Boxen verschiedener Δ12-Desaturasen abgeleitet.

25 Primer A: 5' - CCD TAY TTC TCI TGG AAR WWH AGY CAY CG - 3'
Forward primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
P Y F S W K Y/I S H R

Primer B: 5' - CCA RTY CCA YTC IGW BGA RTC RTA RTG - 3'
30 Reverse primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
H Y D S S/T E W D/N W

Die Buchstaben in Primer A und B haben folgende Bedeutung:

35 R = A/G
Y = C/T
W = A/T
H = A/C/T
B = C/G/T
40 D = A/G/T
I = Inositol

In einer PCR mit *Calendula*-Einzelstrang-cDNA (hergestellt nach Beispiel 1) als Template wurde mit den Primern A und B ein
45 DNA-Fragment mit einer Länge von 470 bp amplifiziert. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

1. 2 min 94 °C
2. 30 sec 94 °C
3. 45 sec 50 °C (Bindungstemperatur)
4. 1 min 72 °C
- 5 10 x 2. bis 4.
5. 0 sec 94 °C
6. 45 sec 50 °C
7. 1 min 72 °C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus
- 20 x 5. Bis 7.
- 10 8. 2 min 72 °C

Für die Amplifikation wurde die Tfl-DNA-Polymerase von Biozym (Hess. Oldendorf) verwendet. Das 470 bp lange DNA-Fragment wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) in
 15 den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert und sequenziert. Die Sequenz des 470 bp-Fragments entsprach der Sequenz von Nukleotid 466 bis 893 von SEQ ID NO:1.

Beispiel 3: Gewinnung und Sequenzierung vollständiger cDNA-Klone 20

Um einen Vollängen-Klon zu erhalten, wurde das Fragment mittels 5'- und 3'- RACE (rapid amplification of cDNA ends) verlängert. Ausgehend von 1 µg mRNA (isoliert nach Beispiel 1) wurde mit dem "Marathon cDNA Amplification Kit" von CLONTECH (Heidelberg)
 25 doppelsträngige cDNA hergestellt. Nach erfolgter Adaptorligation wurde mit folgenden Primern 5'- bzw. 3'-RACE durchgeführt:

Spezifische Primer für 5'-RACE:

- 30 Primer C 5' - GTG AGG GAG TGA GAG ATG GGT GTG GTG C - 3'
 Primer D 5' - AAC ACA CTT ACA CCT AGT ACT GGA ATT G - 3'

Spezifische Primer für 3'-RACE:

- 35 Primer E 5' - TAT TCC AAA CTT CTT AAC AAT CCA CCC G - 3'
 Primer F 5'- CAA TTC CAG TAC TAG GTG TAA GTG TGT T - 3'

Zunächst wurde eine PCR mit der adaptorligierten doppelsträngigen -cDNA und Primer C bzw. E durchgeführt, danach erfolgte eine
 40 zweite PCR mit Primer D bzw. F und einer 1:50-Verdünnung des PCR-Produkts aus der Reaktion mit Primer C bzw. E als Template.

Die RACE-PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. 1 min 94 °C
2. 30 sec 94 °C
- 5 3. 3 min 68 °C
- 10 10 x 2. - 3.
4. 30 sec 94 °C
5. 30 sec 65 °C
6. 3 min 68 °C
7. 5 min 68 °C

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning-Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) in pCR 2.1-TOPO kloniert und sequenziert. Das 5'-RACE-Produkt reichte über das Startkodon in den 5'-nicht-translatierten-Bereich (5'-UTR), das 3'-RACE über das Stopkodon in den 3'- UTR hinein.

Die zusammengesetzte Sequenz bestehend aus dem ersten PCR-Produkt und den RACE-Produkten ist in SEQ ID NO: 1 dargestellt. Der kodierende Bereich erstreckt sich von Nukleotid 42 (Startkodon) bis 1175 (Stopkodon). Die 5'- und 3'-UTRs wurden nur einzelsträngig sequenziert, so daß hier einzelne Sequenzierfehler möglich sind.

Um einen durchgängigen Vollängen-Klon zu erhalten, wurde mit dem Expand High Fidelity-System (Boehringer, Mannheim) und den Primern G und H sowie mit Calendula-cDNA (siehe Beispiel 1) als Template eine PCR durchgeführt.

30 Primer G 5' - ATTAGAGCTCATGGGTGCTGGTGGTCGGATGTCG - 3'
Forward Primer (mit SacI-Schnittstelle)

Primer H 5' - ATTACTCGAGTGACATACACCTTTTGGATTACATCTTG - 3'
Reverse Primer (mit XhoI-Schnittstelle)

35

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. 2 min 94 °C
2. 30 sec 94 °C
- 40 3. 35 sec 63 °C
4. 2 min 72 °C
- 10 x 2. - 4.
5. 30 sec 94 °C
6. 35 sec 63 °C
- 45 7. 2 min 72 °C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus
- 15 x 5. - 7
8. 2 min 72 °C.

Das PCR-Produkt mit einer Länge von 1,2 kb wurde in den Vektor pGEM-T (Promega, Mannheim) kloniert und in *E. coli* DH10B transformiert. Die Insert-DNA wurde mit einem 373 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) doppelsträngig sequenziert. Dazu wurden
5 neben Reverse Primer und -21 Primer folgende sequenzspezifische Primer benutzt:

Primer I: 5' - CGG TCT TCT CGC TGT ATT - 3'

10 Primer J: 5' - ATT ACC CAA GCT GCC C - 3'

Die vollständige DNA-Sequenz der Calendulasäure-Desaturase (CalDes) ist identisch mit dem Abschnitt von Nukleotid 42 bis 1193 von SEQ ID NO:1. Die Sequenz umfaßt den kodierenden Bereich
15 und einen kurzen Abschnitt des 3'-UTR.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Co-CalDes (SEQ ID NO:2) mit annotierten Proteinsequenzen der SWISS-PROT und SP-TREMBL-Datenbanken ergab die höchste Homologie zu einer
20 Δ 12-Acetylenase aus *Crepis alpina* (SP_PL: 081931, 74 % identische Aminosäuren), einer Δ 12-Epoxygenase aus *Crepis palaestina* (SP_PL: 065771, 73 % identische Aminosäuren) und einer Δ 12-Desaturase aus *Borago officinalis* (SP_PL: 082729, 62 % identische Aminosäuren) über den gesamten kodierenden Bereich. Die Sequenzvergleiche sind
25 in Fig.2 dargestellt. Fig. 2 zeigt einen Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Co-CalDes mit Δ 12-Acetylenase aus *Crepis alpina* (Ca-Acetyl), Δ 12-Epoxygenase aus *Crepis palaestina* (Cp-Epoxy) und Δ 12-Desaturase aus *Borago officinalis* (Bo-Des).

30 Beispiel 4: Expression der Calendulasäure-Desaturase in Hefe

Um die Funktionalität von CalDes nachzuweisen, wurde in einem ersten Ansatz der kodierende Bereich der cDNA in einem Hefe-Expressionsvektor kloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Die
35 in der Hefe produzierte Calendulasäure-Desaturase sollte zugesetzte Linolsäure in Calendulasäure umsetzen. Diese wiederum sollte in hydrolisierten Lipidextrakten über HPLC nachgewiesen werden.

40 In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich zu CalDes die Δ 12-Desaturase FAD2 aus *A. thaliana* (Kajiwara et al., Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 4309 - 4313) in Hefe exprimiert, so daß die Hefezellen endogen Linolsäure produzieren, die dann wiederum durch die Aktivität von CalDes in Calendulasäure
45 umgesetzt werden kann. Letztere sollte wiederum über HPLC nachgewiesen werden.

Sämtliche Fest- und Flüssigmedien für Hefe wurden nach Protokollen von Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) hergestellt.

- 5 Die CalDes-cDNA wurde über Restriktionsverdau mit SacI/XhoI aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten, in den SacI/XhoI geschnittenen shuttle-Vektor pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert und der so entstandene Vektor pYES2-CalDes in E. coli XL1 blue transformiert. Nach erneuter Plasmidpräparation mit Hilfe des Plasmid
- 10 Maxi Kits (QIAGEN) wurde pYES2-CalDes mit Hilfe der Polyethylenglycol-Methode (Von Pein M., Dissertation, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 1992) in S. cerevisiae INCSv1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) transformiert, wo die Expression der CalDes-cDNA unter der Kontrolle des GAL1-Promotors stand.

15

Um im zweiten Ansatz zusätzlich zu CalDes auch FAD2 in Hefe exprimieren zu können, wurde zunächst der kodierende Bereich des FAD2-Gens über PCR (Protokoll siehe Primer G und H) aus A. thaliana-cDNA mit Hilfe der Tfl-Polymerase (Biozym) amplifiziert.

- 20 Folgende Primer wurden hierfür verwendet:

Primer K: 5' - AAACTCGAGATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCCGG - 3'
Forward Primer (XhoI-Schnittstelle)

- 25 Primer L: 5' - AAAAAAGCTTTCATAACTTATTGTTGTACCAGTACACACC - 3'
Reverse Primer (HindIII-Schnittstelle)

- Das entstandene PCR-Produkt wurde nach Restriktionsverdau mit XhoI/HindIII in den XhoI/HindIII geschnittenen Hefe-Expressions-
- 30 vektor pESC-Leu (Stratagene) kloniert, wo die FAD2-DNA unter Kontrolle des GAL1-Promotors stand.

- Die Expression von CalDes in S. cerevisiae INCSv1 erfolgte modifiziert nach Avery et al. (Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 3960 - 3966) und Girke et al. (The Plant Journal, 5, 1998: 39 - 48). Um eine Starterkultur herzustellen, wurden 10 ml YPAD-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 48 Stunden lang bei 30 °C bei 200 rpm inkubiert. Die Zellkultur wurde dann in 1 x YPA-Medium ohne Zucker gewaschen und abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml Minimalmedium ohne Supplemente und ohne Zucker resuspendiert. Mit 1 ml dieser Zellsuspension wurden 100 ml Minimalmedium (dropout powder, 2 % Raffinose, 1 % Tergitol NP40) in 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und die Kultur bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden 2 % (w/v)
- 40 Galaktose zugegeben und (für den ersten Ansatz) 0,003 % Linolsäure (3%ige Stammlösung in 5 % Tergitol NP40). Die Zellen wurden weiter kultiviert bis zum Erreichen der stationären Phase. Dann
- 45

wurden sie in Minimalmedium ohne Supplemente gewaschen und bei -20 °C aufbewahrt.

Beispiel 5: Lipidextraktion und HPLC-Analyse der Fettsäuren aus transgener Hefe

Die Hefezellen wurden in 30 ml HIP-Lösung (0,1 mM 2,6-Di-tert.-butyl-4-methyl-phenol in Hexan : Isopropanol (3:2 v/v)) suspendiert, mit 150 µl konzentrierter HCl angesäuert und mit Ultra-
10 Turrax homogenisiert (1 min, 24000 rpm). Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 4 °C geschüttelt und bei 5000 g und 4 °C 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 0,38 M K₂SO₄ auf 47,5 ml aufgefüllt. Die Proben wurden wiederum 10 min lang bei 4 °C geschüttelt und abzen-
15 trifugiert (s.o.). Die Hexanphase wurde abgenommen und unter N₂-Strom eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 µl Chloroform gelöst. Zur alkalischen Hydrolyse von Fettsäure-Estern wurden 400 µl Methanol sowie 80 µl 40 %ige (w/v) KOH-Lösung zugegeben und die Probe 20 min lang bei 60 °C unter Argon inkubiert. Anschlie-
20 ßend wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 35 µl konzentrierter HCl auf pH 3,0 angesäuert und per HPLC aufgetrennt.

Die Trennung der freien Fettsäuren erfolgte mit einer ET 250/4 Nucleosil 120-5 C18-Säule (Macherey & Nagel). Als Laufmittel
25 diente Methanol: H₂O: Eisessig (85:15:0,1 v/v/v). Die Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min und 25 °C, zur Detektion der Konjutriene wurde die Absorption bei 268 nm gemessen.

Fig. 3 zeigt die Elutionsprofile der Lipidextrakte nach alkali-
30 scher Hydrolyse aus transformierten Hefezellen (Fig. 3B, Elutionsprofil von *S. cerevisiae* INCSv1 transformiert mit FAD2-DNA aus *A. thaliana* und C, Elutionsprofil von *S. cerevisiae* INCSv1 transformiert mit pYES2-CalDes aus *Calendula officinalis*) bzw. das Elutionsprofil eines Calendulasäure-Standards (Fig. 3A).
35 Calendulasäure hat eine Retentionszeit von 12 min mit einer für Konjutriene typischen, starken Absorption bei 268 nm. Die hydrolysierten Lipidextrakte von Hefezellen, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert und mit 0,003 % Linolsäure angezogen wurden, weisen keine Fettsäuren mit einer Retentionszeit von Calendula-
40 säure auf (nicht gezeigt). Ebenso enthalten die hydrolysierten Lipidextrakte von Hefezellen, die das FAD2-Gen exprimieren keine Calendulasäure (Fig. 3B).

Die HPLC-Analyse der Extrakte von mit pYES2-CalDes transformier-
45 ten Hefezellen, die mit 0,003 % Linolsäure angezogen wurden, hingegen zeigten ein Signal mit der Retentionszeit von Calendulasäure (Fig. 3C), das auch das gleiche Absorptionsspektrum mit ei-

nem Maximum bei 268 nm und Nebenmaxima bei 258 und 282 nm aufwies wie der Standard (Fig. 4A, Standard und C, Elutionsprofil von *S. cerevisiae* INCSv1 transformiert mit pYES2-CalDes aus *Calendula officinalis*). Damit war gezeigt, daß die Expression von Calendulasäure-Desaturase in Hefe zur Biosynthese von Calendulasäure führt. Der Nachweis von Calendulasäure aus transformierten Hefezellen gelang nur nach Hydrolyse der Lipide. In den freien Fettsäuren dieser Zellen konnte keine Calendulasäure nachgewiesen werden, das heißt Calendulasäure wird in Hefe in Lipide eingebaut. Da Hefe keine Triacylglyceride enthält, muß man davon ausgehen, daß die nachgewiesene Calendulasäure in den Phospholipiden der Hefe gebunden war.

Darüberhinaus enthalten die Lipidextrakte von transgenen Hefezellen, die gleichzeitig FAD2 und CalDes exprimieren ebenfalls Calendulasäure (nicht gezeigt).

Beispiel 6: Expression der Calendulasäure-Desaturase in *Arabidopsis thaliana* und *Linum usitatissimum*

- Die Expression der Calendulasäure-Desaturase aus *Calendula officinalis* in transgenen Pflanzen ist vorteilhaft, um den Calendulasäure-Gehalt in diesen Pflanzen zu erhöhen. Dazu wurde die CalDes cDNA in binäre Vektoren kloniert und über *Agrobacterium*-vermittelten DNA-Transfer in *A. thaliana* und *L. usitatissimum* übertragen. Die Expression der CalDes cDNA stand dabei unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35 S-Promotors bzw. des samenspezifischen USP-Promotors.
- Als Expressionsvektoren wurden der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science, 66, 1990: 221 - 230) bzw. das pBinAR Derivat pBinAR-USP, bei dem der CaMV 35 S-Promotor gegen den USP-Promotor aus *V. faba* ausgetauscht war, verwendet. Zur Umklonierung mußte die CalDes-cDNA aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten werden. Dazu wurde zunächst mit NcoI geschnitten und mit Klenow zu glatten Enden aufgefüllt, anschließend wurde das Insert mit SalI herausgeschnitten und in die SmaI/SalI geschnittenen Vektoren pBinAR bzw. pBinAR-USP kloniert.
- Die entstandenen Plasmide pBinAR-CalDes bzw. pBinAR-USP-CalDes wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (Höfgen und Willmitzer, Nucl. Acids Res., 16, 1988: 9877). Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mittels "floral dip" (Clough und Bent, Plant Journal, 16, 1998: 735 - 743), die von *L. usitatissimum* durch Cokultivierung von Leinen-Hypokotylstücken mit transformierten *A. tumefaciens* Zellen.

Die Expression des CalDes-Gens in transgenen Arabidopsis und Linum Pflanzen wurde über Northern-Blot Analyse untersucht. Ausgewählte Pflanzen wurden auf ihren Gehalt an Calendulasäure im Samenöl untersucht.

5

Analog zum USP-Promotor kann auch der Napin-Promotor verwendet werden, um eine samenspezifische Expression von CalDes zu erreichen.

10

15

20

25

30

35

40

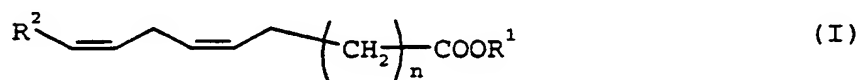
45

Patentansprüche

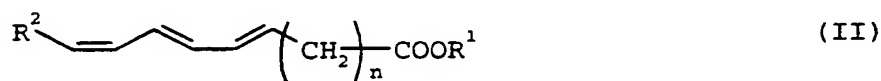
1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit
5 Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
 - 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
 - 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 20 2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in
25 SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 30 5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
6. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz
35 gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
7. Organismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.
- 40 8. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.

9. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
10. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
11. Verfahren zur Herstellung von gesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
12. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
13. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an Calendulasäure aufweisen.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen Mikroorganismus handelt.
15. Ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9.
16. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10.

17. Gesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 11.
18. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 12.
19. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
20. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
21. Verwendung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 15 oder 17 oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 16 oder 18 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika.
22. Enzym, das eine Fettsäure der allgemeinen Struktur I,

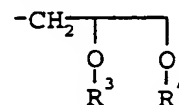


die zwei durch eine Methylengruppe voneinander getrennte Doppelbindungen aufweist, zu einer dreifach ungesättigten Fettsäure der allgemeinen Struktur II



umsetzt, wobei die drei Doppelbindungen der Fettsäure in Konjugation sind und wobei die Substituenten und Variablen in den Verbindungen der allgemeinen Struktur I und II folgende Bedeutung haben:

R^1 = Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigte oder gesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C_1 - C_{10} -Alkyl-,



R^2 = substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes C_1 - C_9 -Alkyl-

5 R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C_1 - C_{22} -Alkylcarbonyl- oder Phospho-,

n = 1 bis 14

10

15

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Institut für Pflanzenbiochemie

<120> Fettsäure-Desaturase-Gen aus Pflanzen

<130> Sequenz_Desaturase

<140> 50669

<141> 1999-08-31

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1285

<212> DNA

<213> Calendula officinalis

<220>

<221> CDS

<222> (42)..(1175)

<400> 1

```

aaaagctcac ttctctgtga gggtaattat atatcaacaa c atg ggt gct ggt ggt 56
                                         Met Gly Ala Gly Gly
                                         1             5

```

```

cgg atg tcg gat cca tct gag gga aaa aac atc ctt gaa cgt gtg cca 104
Arg Met Ser Asp Pro Ser Glu Gly Lys Asn Ile Leu Glu Arg Val Pro
          10             15             20

```

```

gtc gat cca ccg ttc acg tta agc gat ctg aag aaa gcg att cct acc 152
Val Asp Pro Pro Phe Thr Leu Ser Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Thr
          25             30             35

```

```

cat tgc ttt gag cga tct gtc atc cgg tca tca tac tat gtt gtt cat 200
His Cys Phe Glu Arg Ser Val Ile Arg Ser Ser Tyr Tyr Val Val His
          40             45             50

```

```

gat ctc att gtt gcc tat gtc ttc tac tac ctt gca aac acg tat atc 248
Asp Leu Ile Val Ala Tyr Val Phe Tyr Tyr Leu Ala Asn Thr Tyr Ile
          55             60             65

```

```

cct ctt att cct aca cct ctg gct tac cta gca tgg ccc gtt tac tgg 296
Pro Leu Ile Pro Thr Pro Leu Ala Tyr Leu Ala Trp Pro Val Tyr Trp
          70             75             80             85

```

```

ttt tgt caa gct agc atc ctc acc ggc ctc tgg gtc atc ggt cac gaa 344
Phe Cys Gln Ala Ser Ile Leu Thr Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu

```


90								95				100				
tgt	ggt	cac	cat	gca	ttt	agc	gac	tac	cag	ttg	att	gat	gac	att	gtt	392
Cys	Gly	His	His	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu	Ile	Asp	Asp	Ile	Val	
105				110				115								
gga	ttc	gtg	ctc	cat	tcg	gct	ctc	ctc	acc	ccg	tat	ttc	tct	tgg	aaa	440
Gly	Phe	Val	Leu	His	Ser	Ala	Leu	Leu	Thr	Pro	Tyr	Phe	Ser	Trp	Lys	
120				125				130								
tat	agc	cac	agg	aat	cac	cac	gcc	aac	aca	aat	tca	ctc	gat	aac	gat	488
Tyr	Ser	His	Arg	Asn	His	His	Ala	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	Asn	Asp	
135				140				145								
gaa	gtt	tac	att	cct	aaa	cgt	aag	tcg	aag	gtc	aag	att	tat	tcc	aaa	536
Glu	Val	Tyr	Ile	Pro	Lys	Arg	Lys	Ser	Lys	Val	Lys	Ile	Tyr	Ser	Lys	
150				155				160				165				
ctt	ctt	aac	aat	cca	ccc	ggg	cga	gtg	ttc	act	ttg	gtg	ttt	cgg	ttg	584
Leu	Leu	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Arg	Val	Phe	Thr	Leu	Val	Phe	Arg	Leu	
170				175				180								
act	tta	gga	ttt	ccg	tta	tac	ctc	tta	act	aat	atc	tcg	ggc	aag	aaa	632
Thr	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asn	Ile	Ser	Gly	Lys	Lys	
185				190				195								
tac	ggg	agg	ttt	gcc	aac	cac	ttt	gat	ccc	atg	agt	cca	att	ttc	aac	680
Tyr	Gly	Arg	Phe	Ala	Asn	His	Phe	Asp	Pro	Met	Ser	Pro	Ile	Phe	Asn	
200				205				210								
gat	cgt	gaa	cgc	gtt	caa	gtt	ttg	cta	tcc	gat	ttc	ggt	ctt	ctc	gct	728
Asp	Arg	Glu	Arg	Val	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Asp	Phe	Gly	Leu	Leu	Ala	
215				220				225								
gta	ttt	tat	gca	atc	aag	ctt	ctt	gta	gca	gca	aaa	ggg	gca	gct	tgg	776
Val	Phe	Tyr	Ala	Ile	Lys	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Trp	
230				235				240				245				
gta	atc	aac	atg	tac	gca	att	cca	gta	cta	ggt	gta	agc	gtg	ttc	ttc	824
Val	Ile	Asn	Met	Tyr	Ala	Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Phe	Phe	
250				255				260								
gtt	ttg	atc	aca	tat	ttg	cac	cac	acc	cat	ctc	tca	ctc	cct	cat	tat	872
Val	Leu	Ile	Thr	Tyr	Leu	His	His	Thr	His	Leu	Ser	Leu	Pro	His	Tyr	
265				270				275								
gat	tca	acc	gaa	tgg	aac	tgg	atc	aaa	ggc	gcc	tta	tca	aca	atc	gat	920
Asp	Ser	Thr	Glu	Trp	Asn	Trp	Ile	Lys	Gly	Ala	Leu	Ser	Thr	Ile	Asp	
280				285				290								
agg	gat	ttc	ggg	ttc	ctg	aat	cgg	gtt	ttc	cac	gac	gtt	aca	cac	act	968

Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Arg Val Phe His Asp Val Thr His Thr
 295 300 305

 cac gtc ttg cat cat ttg atc tca tac att cca cat tat cat gca aag 1016
 His Val Leu His His Leu Ile Ser Tyr Ile Pro His Tyr His Ala Lys
 310 315 320 325

 gaa gca agg gat gca atc aag cca gtg ttg ggc gag tac tat aaa atc 1064
 Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Val Leu Gly Glu Tyr Tyr Lys Ile
 330 335 340

 gac agg act cca att ttc aaa gca atg tat aga gag gct aag gaa tgc 1112
 Asp Arg Thr Pro Ile Phe Lys Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys
 345 350 355

 atc tac atc gag ccc gat gag gat agc gag cac aaa ggt gtg ttc tgg 1160
 Ile Tyr Ile Glu Pro Asp Glu Asp Ser Glu His Lys Gly Val Phe Trp
 360 365 370

 tac cac aag atg taa tcaaaaagggt gtatgtcaat gcaattgtat gcttaattaa 1215
 Tyr His Lys Met
 375

 gttgttaaac tttctattcc gtgtaataaa ttatcattaa gagaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1275

 aaaaaaaaaa 1285

 <210> 2
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Calendula officinalis

 <400> 2
 Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Ser Asp Pro Ser Glu Gly Lys Asn Ile
 1 5 10 15

 Leu Glu Arg Val Pro Val Asp Pro Pro Phe Thr Leu Ser Asp Leu Lys
 20 25 30

 Lys Ala Ile Pro Thr His Cys Phe Glu Arg Ser Val Ile Arg Ser Ser
 35 40 45

 Tyr Tyr Val Val His Asp Leu Ile Val Ala Tyr Val Phe Tyr Tyr Leu
 50 55 60

 Ala Asn Thr Tyr Ile Pro Leu Ile Pro Thr Pro Leu Ala Tyr Leu Ala
 65 70 75 80

 Trp Pro Val Tyr Trp Phe Cys Gln Ala Ser Ile Leu Thr Gly Leu Trp
 85 90 95

Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Leu
 100 105 110

Ile Asp Asp Ile Val Gly Phe Val Leu His Ser Ala Leu Leu Thr Pro
 115 120 125

Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn
 130 135 140

Ser Leu Asp Asn Asp Glu Val Tyr Ile Pro Lys Arg Lys Ser Lys Val
 145 150 155 160

Lys Ile Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Phe Thr
 165 170 175

Leu Val Phe Arg Leu Thr Leu Gly Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Thr Asn
 180 185 190

Ile Ser Gly Lys Lys Tyr Gly Arg Phe Ala Asn His Phe Asp Pro Met
 195 200 205

Ser Pro Ile Phe Asn Asp Arg Glu Arg Val Gln Val Leu Leu Ser Asp
 210 215 220

Phe Gly Leu Leu Ala Val Phe Tyr Ala Ile Lys Leu Leu Val Ala Ala
 225 230 235 240

Lys Gly Ala Ala Trp Val Ile Asn Met Tyr Ala Ile Pro Val Leu Gly
 245 250 255

Val Ser Val Phe Phe Val Leu Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Leu
 260 265 270

Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asn Trp Ile Lys Gly Ala
 275 280 285

Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Arg Val Phe His
 290 295 300

Asp Val Thr His Thr His Val Leu His His Leu Ile Ser Tyr Ile Pro
 305 310 315 320

His Tyr His Ala Lys Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Val Leu Gly
 325 330 335

Glu Tyr Tyr Lys Ile Asp Arg Thr Pro Ile Phe Lys Ala Met Tyr Arg
 340 345 350

Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Ile Glu Pro Asp Glu Asp Ser Glu His
 355 360 365

Lys Gly Val Phe Trp Tyr His Lys Met
370 375

FIG.1

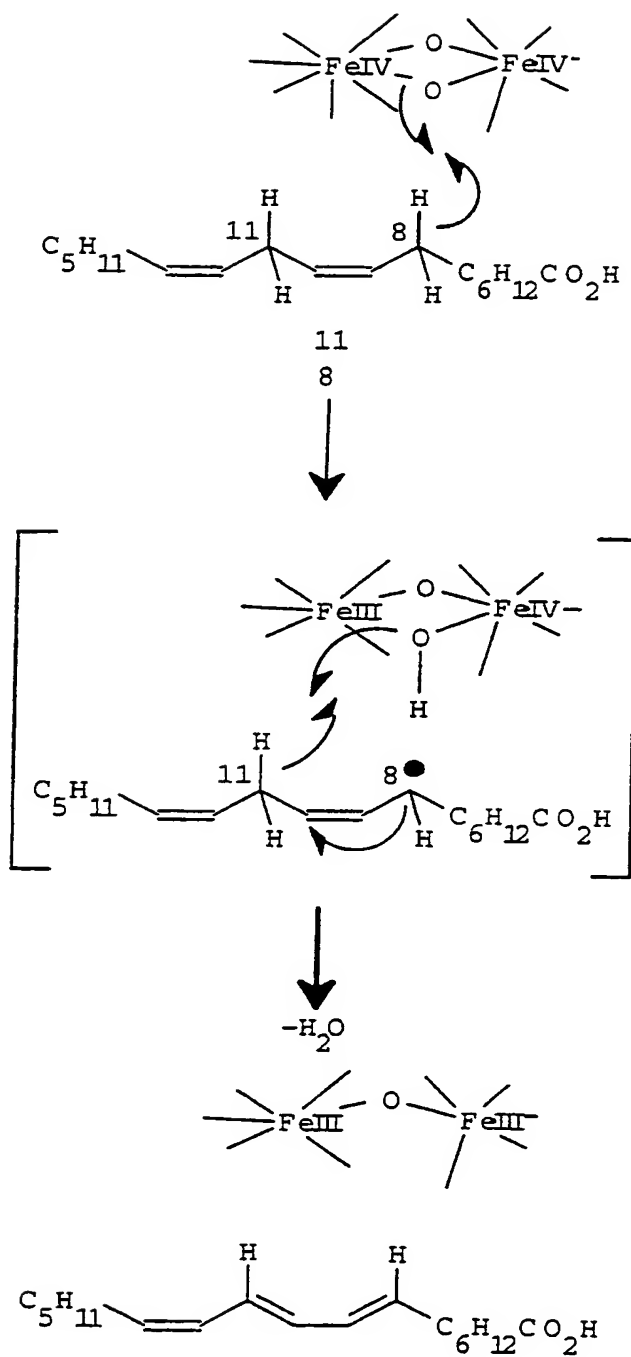


FIG.2

	1				50
Co-CalDes	MGAGGRMSDP	SEGK....NI	LERVPVDP.P	FTLSDLKKAI	PTHCFERSVI
Ca-Acetyl	MGGGGR.GRT	SQ.K....PL	MERVSVD.P	FTVSDLKQAI	PPHCFKRSVI
Cp-Epoxy	MGAGGR.GRT	SE.K....SV	MERVSVD.PVT	FSLSELKQAI	PPHCFQRSVI
Bo-Des	MGGGGRMPVP	TKGKKS KSDV	FQRPVSEKPP	FTVGDLKKVI	PPHCFQRSVL
	51				100
Co-CalDes	RSSYYVVHDL	IVAYVFYYLA	NTYIPLIPTP	LAYLAWPVYW	FCQASILTGL
Ca-Acetyl	RSSYYIVHDA	IIAYIFYFLA	DKYIPILPAP	LAYLAWPLYW	FCQASILTGL
Cp-Epoxy	RSSYYVVQDL	IIAYIFYFLA	NTYIPTLPTS	LAYLAWPVYW	FCQASVLTGL
Bo-Des	HSFSYVVYDL	VIAALFFYTA	SRYIHLQPHP	LSYVAWPLYW	FCQGSVLTGV
	101				150
Co-CalDes	WVIGHECGHH	AFSDYQLIDD	IVGFVLHSAL	LTPYFSWKYS	HRNHHANTNS
Ca-Acetyl	WVIGHECGHH	AFSDYQWVDD	TVGFILHSFL	MTPYFSWKYS	HRNHHANTNS
Cp-Epoxy	WILGHECGHH	AFSNYTFWDD	TVGFILHSFL	LTPYFSWKFS	HRNHSNTSS
Bo-Des	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLLLHSAL	LVPYFSWKYS	HRRHHSNTGS
	151				200
Co-CalDes	LDNDEVYIPK	RKSKVKIYSK	LLNPPGRVF	TLVFRLTLGF	PLYLLTNISG
Ca-Acetyl	LDNDEVYIPK	SKAKVALYK	VLNHPGRLL	IMFITFTLGF	PLYLFTNISG
Cp-Epoxy	IDNDEVYIPK	SKSKLARIYK	LLNPPGRLL	VLIIMFTLGF	PLYLLTNISG
Bo-Des	LERDEVFVPK	KRSGISWSSE	YLNPPGRVL	VLLVQLTLGW	PLYLMFNVS
	201				250
Co-CalDes	KKYGRFANHF	DPMSPIFNDR	ERVQVLLSDF	GLLAVFYAIK	LLVAAKGAAW
Ca-Acetyl	KKYERFANHF	DPMSPIFKER	ERFQVLLSDL	GLLAVLYGVK	LAVAAKGAAW
Cp-Epoxy	KKYDRFANHF	DPMSPIFKER	ERFQVFLSDL	GLLAVFYGIK	VAVANKGAAW
Bo-Des	RPYDRFACHF	DPKSPIYNDR	ERLQIYISDA	GIVAVMYGLY	RLVAAKGVAV
	251				300
Co-CalDes	VINMYAIPVL	GVSVFFVLIT	YLHHTHLSLP	HYDSTEWNWI	KGALSTIDRD
Ca-Acetyl	VTCIYGIPVL	GVFIFFDIIT	YLHHTHLSLP	HYDSSEWNWL	RGALSTIDRD
Cp-Epoxy	VACMYGVPVL	GVFTFFDVIT	FLHHTHQSSP	HYDSTEWNWI	RGALSAIDRD
Bo-Des	VVCYYGVPLL	VVNGFLVLIT	YLQHTQPSLP	HYDSSEWDWL	KGALATVDRD
	301				350
Co-CalDes	FGFLNRVFDH	VTHTHVLHHL	ISYIPHYHAK	EARDAIKPVL	GEYYKIDRTP
Ca-Acetyl	FGFLNSVLHD	VTHTHVMHHL	FSYIPHYHAK	EARDINTVL	GDFYKIDRTP
Cp-Epoxy	FGFLNSVFDH	VTHTHVMHHL	FSYIPHYHAK	EARDAIKPIL	GDFYKIDRTP
Bo-Des	YGFLNKVLHN	ITDTHVAHHL	FSTMPHYHAM	EATKAIKPIL	GDYYQCDRTP
	351			384	
Co-CalDes	IFKAMYREAK	ECIYIEPDED	SEHKGVFVWY.	HKM*	
Ca-Acetyl	ILKAMWREAK	ECIFIEPEKG	RESKGVVWY.	NKF*	
Cp-Epoxy	ILKAMWREGR	ECMYIEPDS.	.KLKGVVWY.	HKL*	
Bo-Des	VFKAMYREVK	ECIYVEADEG	DNKKGVFVWY	NKL*	

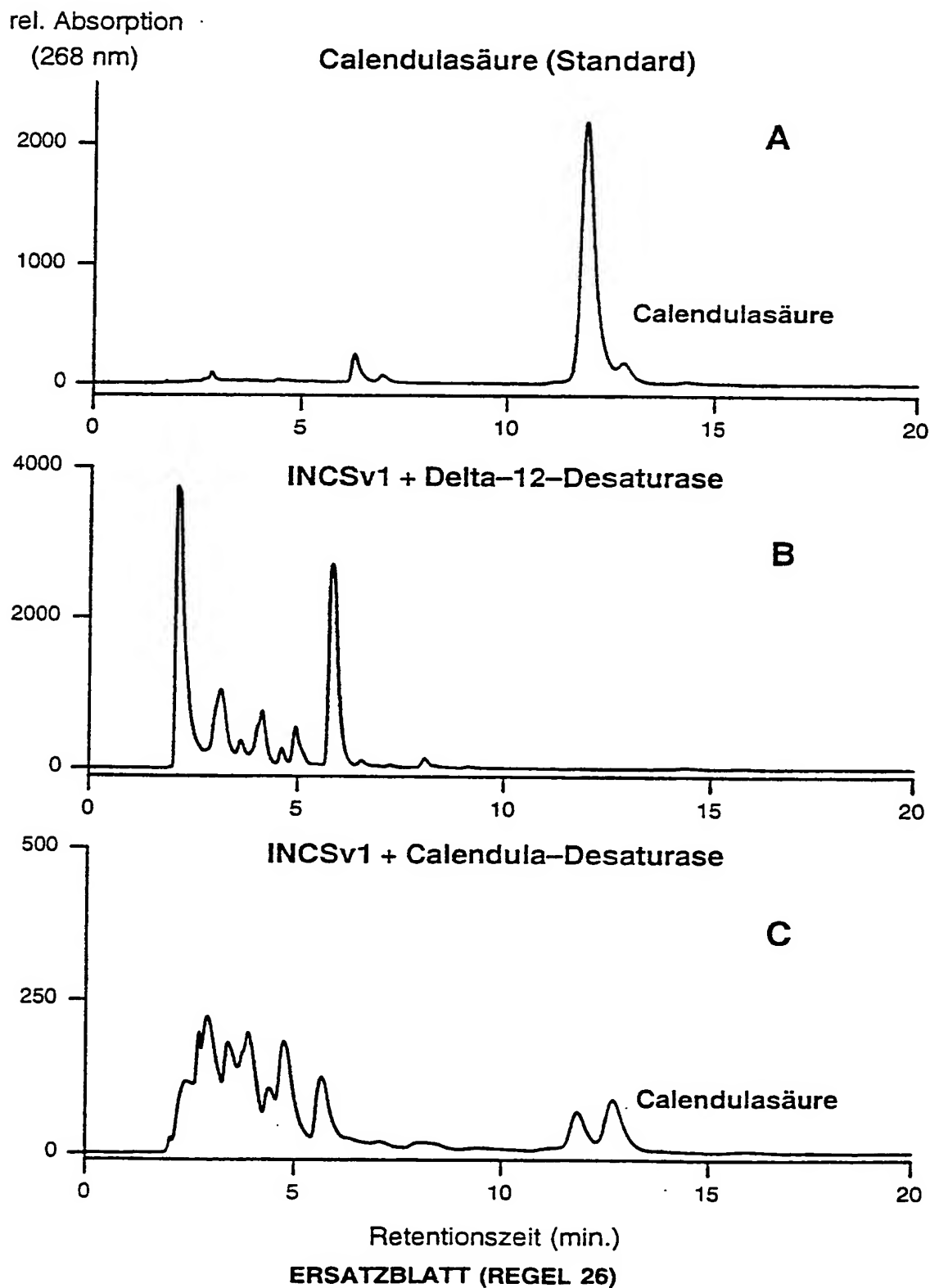
FIG.3

FIG.4

